



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA - UFPB
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - CCA
CURSO DE BACHARELADO EM AGRONOMIA

JOSÉ LOURIVALDO DA SILVA

DETERMINAÇÃO DO NÚMERO CROMOSSÔMICO E COMPOSIÇÃO
DA HETEROCROMATINA EM ESPÉCIES DA SUBTRIBO
Pleurothallidinae Lindl. (Orchidaceae)

AREIA – PB
Dezembro de 2018

JOSÉ LOURIVALDO DA SILVA

**DETERMINAÇÃO DO NÚMERO CROMOSSÔMICO E COMPOSIÇÃO
DA HETEROCROMATINA EM ESPÉCIES DA SUBTRIBO
Pleurothallidinae Lindl. (Orchidaceae)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a
Universidade Federal da Paraíba, Centro de
Ciências agrárias – *Campus II*, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Bacharel em Agronomia.

Prof. Dr. Leonardo Pessoa Felix
Orientador

Dra. Angeline Maria da Silva Santos
Coorientadora

Catálogo na publicação
Seção de Catálogo e Classificação

S586d Silva, José Lourivaldo da.

DETERMINAÇÃO DO NÚMERO CROMOSSÔMICO E COMPOSIÇÃO DA
HETEROCROMATINA EM ESPÉCIES DA SUBTRIBO
Pleurothallidinae Lindl. (Orchidaceae) / José
Lourivaldo da Silva. - Areia, 2018.
34 f. : il.

Orientação: Leonardo Pessoa Felix.
Coorientação: Angeline Maria da Silva Santos.
Monografia (Graduação) - UFPB/CCA.

1. Acianthera. 2. Anathallis. 3. Citotaxonomia. 4.
CMA/DAPI. 5. Epidendroideae. 6. Specklinia. 7. Stelis.
I. Felix, Leonardo Pessoa. II. Santos, Angeline Maria
da Silva. III. Título.

UFPB/CCA-AREIA

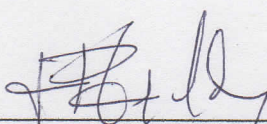
JOSÉ LOURIVALDO DA SILVA

**DETERMINAÇÃO DO NÚMERO CROMOSSÔMICO E COMPOSIÇÃO
DA HETEROCROMATINA EM ESPÉCIES DA SUBTRIBO
Pleurothallidinae Lindl. (Orchidaceae)**

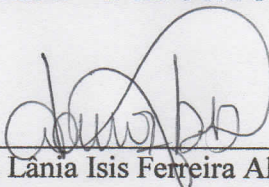
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a
Universidade Federal da Paraíba, Centro de
Ciências agrárias – *Campus II*, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Bacharel em Agronomia.

Aprovado em 07 de dezembro de 2018.

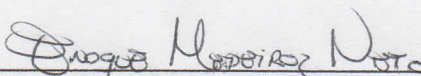
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Leonardo Pessoa Felix (Orientador)
Orientador – DCB/CCA/UFPB



Dra. Lânia Isis Ferreira Alves
Examinadora – INSA



Me. Enoque Medeiros Neto
Examinador – PPGA/CCA/UFPB

Dedico esta conquista primeiramente a Deus, que sempre me deu forças para poder continuar esta jornada. A minha mãe, Cícera Maria da Silva, que sempre acreditou em mim e sempre me incentivou, por todos os esforços que ela fez e faz por mim, por toda dedicação, amor, carinho, afeto, companheirismo e amizade desde o início de minha vida.

Dedico!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, Ele que nunca me abandonou e sempre esteve presente em todos os momentos de minha vida e sem ele essa conquista já mais seria possível.

A minha Família: Minha Mãe, Cícera Maria da Silva, que sempre fez de tudo e mais um pouco para me ver realizando a tão sonhada formatura. A ela, minha eterna gratidão! As minhas tias, Hozana, Rosenice, por sempre terem acreditado e me incentivado, e em especial titia Roseane e titio José, que além de tios sempre foram meus amigos, apoiaram minhas decisões e me incentivaram ao longo de minha jornada, além de serem exemplos de pessoa a se seguir. Aos meus Avós José Viturino e Maria das Dores (*In memoriam*). Aos meus irmãos, Edvaldo, Erivoneide e Jennyffer que indiretamente contribuíram a realização deste sonho. Aos meus primos Rafael (mais que primo, irmão) Vinícius, Lourhan, Luan, Katia, Clécia, Rosa (que tenho como uma tia) e demais primos(as) que sempre acreditaram em meu sucesso ao longo desta jornada.

A família que Deus me deu: Angeline Santos, ela que foi minha Coorientadora (me aconselhando incentivando, na etapa final ciclo), sendo minha melhor amiga, namorada, noiva e, em breve, esposa, além de ter estado ao meu lado nesta jornada, sempre me apoiando, orientando e pela oportunidade de poder fazer parte de sua vida além de me mostrar como é amar e ser amado de verdade. A ela, meu respeito, amor, carinho e muito obrigado! A minha sogra Dona Geovania, que tenho como uma mãe, pois me acolheu em sua casa e vida, me tratando como um filho. A ela meu total respeito, carinho e admiração! A meu cunhado Risomar e minha cunhada Aline, exemplos de pessoas a se seguir, e que tenho a honra de poder dizer que faço parte desta família.

Ao professor Leonardo Felix, exemplo de pessoa e profissional que quero seguir e que me deu a oportunidade de trabalhar no melhor laboratório do CCA-UFPB, além de ter contribuído fortemente para minha formação profissional e pessoal.

A professora Márcia Miranda, exemplo de profissional e pessoa que quero seguir que contribuiu com minha formação profissional e pessoal, desde o início de minha jornada na graduação me acolheu como um filho. A ela, meu total respeito e carinho.

A todos os professores que contribuíram decisivamente para minha formação acadêmica, profissional, pessoal e por todos os ensinamentos valiosos. Agradeço aos meus amigos professores que me ensinaram com prazer e dedicação ao decorrer destes cinco anos.

A Dra. Lânia Isis Ferreira Alves e o Me. Enoque Medeiros Neto por todas as contribuições e sugestões dadas a este trabalho.

Aos amigos de laboratório Seu Saulo, Luciana, Maria José, Enoque, Cláudio, Achilles, Joel, Rodrigo, Felipe Nollet, Harrison, Erton, William, Amanda, Ingrid, Sibelle, Karla, Ronimeire, Rosemere, Cattleya e Profa. Ana Emília por terem contribuído diretamente ou indiretamente em minha formação.

A Eliete Nahana, Cinthia Carla, Elton Douglas, Eduardo Felipe, Davy Bérghamo e Uanderson por terem se tornado mais que amigos, irmãos, que sempre me incentivaram e me apoiaram ao longo desta jornada.

Aos amigos de quarto Eliercio, Hilário, Júnior e aos demais colegas de alojamento por todos os momentos vividos ao longo desta jornada.

A todos os colegas de turma que sempre estiveram ao meu lado, por toda ajuda mutua que sempre teve ao longo destes cinco anos e que de certa forma contribuíram para minha formação. A todos vocês, meu muito obrigado!

Aos amigos que a cidade de Areia me deu, como Dona Elci, Carolina, Annie, Dona Liana e Alícia, Seu Ronaldo e Candin.

A aquelas pessoas que passaram pela minha vida e que de alguma forma contribuíram diretamente ou indiretamente para a concretização deste sonho e para a construção de quem sou hoje.

Obrigado!

“A natureza não faz nada em vão.”

Aristóteles

RESUMO

Pleurothallidinae é uma das maiores subtribos da família Orchidaceae, com cerca de 4.570 espécies e um grupo morfológicamente muito variável. Entretanto, é pouco estudado cariologicamente tanto em número cromossômico quanto ao padrão de bandas heterocromáticas. Portanto, este trabalho tem como objetivo determinar o número cromossômico e identificar a composição de bandas heterocromáticas em espécies brasileiras da subtribo Pleurothallidinae. As espécies analisadas tiveram as pontas de raízes pré-tratadas com paradiclorobenzeno (PDB) e foram preparadas lâminas pelo método do esmagamento em ácido acético, para posteriormente serem coradas com fluorocromos CMA/DAPI. Os números cromossômicos variaram de $2n = 20$ em duas espécies de *Specklinia* a $2n = 40$ em três espécies de *Acianthera*, com tamanho cromossômico médio variando de $1,3\mu\text{m}$ a $2,8\mu\text{m}$. Quanto a morfologia do cariótipo, predominaram cromossomos metacêntricos e submetacêntricos para todas as espécies, com exceção de *Anathallis rubens* que apresentou um par acrocêntrico pequeno. De modo geral, os cariótipos foram relativamente simétricos, com exceção de uma espécie indeterminada de *Anathallis* que apresentou cariótipo fortemente bimodal, sendo sete pares de cromossomos maiores e 12 pares de cromossomos menores. O uso da técnica de dupla coloração com fluorocromos CMA/DAPI permitiu a identificação de quatro padrões de bandas heterocromáticas: $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^-$, $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^0$, $\text{DAPI}^+/\text{CMA}^-$ e $\text{DAPI}^+/\text{CMA}^0$, variando em número, localização e tamanho entre espécies e os gêneros estudados. No entanto, a espécie *Anathallis rubens* não observou nenhuma banda heterocromática e todas as espécies do gênero *Stelis* apresentaram uma banda heteromórfica CMA^+ por complemento monoploide. As espécies analisadas aqui apresentaram bandas heterocromáticas CMA^+ e DAPI^+ , sendo a identificação da composição heterocromática uma importante ferramenta citotaxonômica para o grupo.

Palavras-Chave: *Acianthera*. *Anathallis*. Citotaxonomia. CMA/DAPI. Epidendroideae. *Specklinia*. *Stelis*.

ABSTRACT

Pleurothallidinae is one of the largest subtribes of the Orchidaceae family, with about 4.570 species and a morphologically variable group. However, it is poorly studied in both chromosomal and heterochromatic bands. Therefore, this work aims to determine the chromosome number and to identify the composition of heterochromatic bands in Brazilian species of the subtribe Pleurothallidinae. The species analyzed had root tips pretreated with paradichlorobenzene (PDB) and slides were prepared by the acetic acid crushing method, and then stained with CMA/DAPI fluorochromes. Chromosome numbers varied from $2n = 20$ in two species of *Specklinia* to $2n = 40$ in three species of *Acianthera*, with a mean chromosome size ranging from 1.3 μ m to 2.8 μ m. Regarding the morphology of the karyotype, metacentric and submetacentric chromosomes predominated for all species, except for *Anathallis rubens*, which presented a small acrocentric pair. In general, the karyotypes were relatively symmetrical, except for an indeterminate species of *Anathallis* that presented a strongly bimodal karyotype, being seven pairs of larger chromosomes and 12 pairs of smaller chromosomes. The use of the double staining technique with fluorochromes allowed the identification of four patterns of heterochromatic bands: CMA⁺/DAPI⁻, CMA⁺/DAPI⁰, DAPI⁺/CMA⁻ e DAPI⁺/CMA⁰, varying in number, location and size between species and the studied genus. However, the species *Anathallis rubens* did not observe any heterochromatic bands and all species of the genus *Stelis* presented a heteromorphic band CMA⁺ by monoploid complement. The species analyzed here presented heterochromatic bands CMA⁺ and DAPI⁺, being the identification of the heterochromatic composition an important cytotaxonomic appliance for the group.

Keywords: *Acianthera*. *Anathallis*. CMA/DAPI. Cytotaxonomy. Epidendroideae. *Specklinia*. *Stelis*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Metáfases mitóticas das espécies da subtribo Pleurothallidinae coradas com os fluorocromos CMA/DAPI. **A.** *Acianthera capillaris* com $2n = 40$; **B.** *Acianthera macuconensis* com $2n = 34$; **C.** *Acianthera panduripetala* com $2n = 40$; **D.** *Acianthera saundersiana* com $2n = 36$; **E.** *Stelis aprica* com $2n = 32$; **G.** *Stelis intermedia* com $2n = 32$; **G.** *Stelis loefgrenii* com $2n = 32$. Barra em **G** corresponde a $10\mu\text{m}$ 27
- Figura 2 – Metáfases mitóticas das espécies da subtribo Pleurothallidinae coradas com os fluorocromos CMA/DAPI. **A.** *Anathallis rubens* com $2n = 30$; **B.** *Anathallis rubens* com $2n = 30$; **C.** *Anathallis* sp. com $2n = 38$; **D.** *Specklinia grobyi* com $2n = 20$; **E.** *Specklinia picta* com $2n = 20$; Barra em **E** corresponde a $10\mu\text{m}$ 28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Espécies subtribo Pleurothallidinae analisadas por meio de dupla coloração com fluorocromos. Sumarizadas por gênero e espécie, coletor e número, local de coleta, contagens cromossômicas prévias (CP), números cromossômicos determinados no presente trabalho (PT), tipos de bandas CMA/DAPI e variação do tamanho médio cromossômico (μm)	25
--	----

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo Geral	15
2.2	Objetivos Específicos	15
3.	REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1	Família Orchidaceae	16
3.2	Subtribo Pleurothallidinae	18
3.3	Bandeamento Cromossômico	19
4.	MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1	Material Analisado	20
4.2	Análise Cromossômica	20
4.3	Coloração com Fluorocromos CMA/DAPI	20
5.	RESULTADOS	21
5.1	Números Cromossômicos	21
5.2	Bandeamento CMA/DAPI	21
6.	DISCUSSÃO	22
6.1	Variação Cromossômica Numérica	22
6.2	Variações no Padrão de Bandas CMA/DAPI.....	23
7.	CONCLUSÃO	28
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

1. INTRODUÇÃO

Pleurothallidinae Lindl. forma um grupo monofilético (PRIDGEON et al., 2001; van den BERG et al., 2009; CHIRON et al., 2012), composto por 38 gêneros e cerca de 4.570 espécies (CHASE et al., 2015), equivalendo a aproximadamente 16% da família Orchidaceae, maior família das monocotiledôneas (CHRISTENHUSZ & BYNG, 2016). Está contida na tribo Epidendreae, que por sua vez, integra uma das sete tribos que compõe a subfamília Epidendroideae (PRIDGEON & CHASE, 2001; PRIDGEON et al., 2001). São plantas exclusivamente neotropicais, com maior diversidade de espécies nas florestas úmidas da Costa Rica, Panamá, Colômbia, Equador, Venezuela, Peru e Brasil (PRIDGEON, 1982a, b; LUER, 1986; NEYLAND et al., 1995; PRIDGEON et al., 2005). No Brasil, está representada por 22 gêneros e 591 espécies, das quais 436 são endêmicas, distribuídas principalmente pelas Florestas de Mata Atlântica (FLORA DO BRASIL, 2020 em construção). São plantas geralmente epífitas, podendo também ocorrer como rupícolas e mais raramente, como terrestres (LUER, 1986). Caracterizam-se por apresentar crescimento simpodial, rizoma curto ou mais ou menos rastejante, ramicaules sem pseudobulbos, unifoliados, inflorescência terminal ou raramente lateral, simples ou fasciculada, folhas principalmente coriáceas, conduplicadas e flores com uma articulação entre o pedicelo e o ovário (PRIDGEON & CHASE, 2003).

A subtribo tem sido frequentemente reorganizada taxonomicamente ao longo dos anos (LUER, 2007; CHASE & PRIDGEON, 2001; BARROS, 2005; KARREMANS, 2016), como resultado de várias análises filogenéticas baseadas em sequências de DNA nuclear e plastidial (PRIDGEON et al., 2001; PRIDGEON & CHASE, 2001, 2003; CHIRON & van den BERG, 2012; CHASE et al., 2015). Essas novas propostas de tratamento taxonômico têm gerado bastante polêmica, pois contrariam sistemas de classificação tradicionais baseados em caracteres da morfologia floral (LUER, 1986) que seriam supostamente não monofiléticos. Essas hipóteses de filogenia têm resultado na ampliação dos gêneros de Pleurothallidinae de 29, conforme a classificação de Luer (1986) para os atuais 38 gêneros (PRIDGEON & CHASE, 2001; PRIDGEON et al., 2005; CHASE et al., 2015).

Apesar de constituir uma das maiores subtribos da família Orchidaceae, Pleurothallidinae é pouco conhecida cariológicamente. Dos 38 gêneros reconhecidos atualmente, para apenas 12 existem números cromossômicos reportados pela literatura, com apenas 65 espécies analisadas cariológicamente, o que corresponde a aproximadamente 1,42% de toda a subtribo (NAKATA & HASHIMOTO, 1983; FELIX & GUERRA, 2010; OLIVEIRA et al., 2015). Por outro lado, ocorre uma expressiva variação nos números cromossômicos da

subtribo, que possui como número básico primário mais provável $x = 20$, embora sejam conhecidos outros números básicos secundários, como $x_2 = 10$ para *Specklinia* Lindl., $x_2 = 16$ para *Pabstiella* Brieger & Senghas e *Stelis* Sw., $x_2 = 21$ em *Pleurothallopsis* Porto & Brade (FELIX & GUERRA, 2010; OLIVEIRA et al., 2015). A variação cromossômica numérica registrada para a subtribo vai desde $2n = 20$ para *Specklinia grobyi* (Bateman ex Lindl.) F.Barros a $2n = 84$ em *Pleurothallis bivalvis* Lindl. (NAKATA & HASHIMOTO, 1983; FELIX & GUERRA, 2010), sugerindo que a poliploidia atua na evolução cromossômica da subtribo. Números cromossômicos de $x = 20$, como $2n = 28, 30, 32, 40, 42$, frequentes na subtribo, são indicativos de dispoloidia (OLIVEIRA et al., 2015).

Por ser um grupo numericamente variável, algumas linhagens de Pleurothallidinae são numericamente estáveis ou tem pequenas variações numéricas, como nos gêneros *Acianthera* (Scheidw.) Luer e *Stelis*. Além disso, a família Orchidaceae, em particular as Pleurothallidinae, são grupos taxonomicamente complexos, com espécies e gêneros difíceis de serem identificados devido a grande diversidade das espécies. Quando grupos assim são numericamente variáveis, a simples identificação do número cromossômico constitui um elemento citotaxonomicamente importante, como na separação dos gêneros *Alstroemeria* L. com $2n = 16$ e *Bomarea* Mirb. com $2n = 18$ (AAGESEN & SANSONO, 2003). Por outro lado, grupos numericamente estáveis como o gênero *Alstroemeria*, a utilização de técnicas de coloração diferencial tem se mostrado mais eficaz na caracterização citotaxonômica desses grupos (CHACÓN et al., 2012). Na subtribo Pleurothallidinae, algumas linhagens foram caracterizadas citotaxonomicamente pelo uso da técnica de coloração com os fluorocromos CMA (Cromomicina A3) e DAPI (4'-6 e diamidino-2-fenil indol). No gênero *Acianthera*, a secção *Sicarieae* subsecção *Pectinata* (Luer) Chiron & van den Berg, foi caracterizada por apresentar grandes blocos proximais de heterocromatina DAPI⁺, enquanto *Stelis* exibiu apenas uma pequena quantidade de heterocromatina constitutiva (OLIVEIRA et al., 2015). Esses fluorocromos diferenciam regiões de heterocromatina constitutiva, pela propriedade de corar mais fortemente com CMA a heterocromatina rica nos pares de base GC e com DAPI, a heterocromatina rica em AT (GUERRA, 2000; EL-TWAB et al., 2011). O padrão de bandas obtido pelo uso desses fluorocromos permite a identificação de polimorfismos e variantes em linhagens de plantas numericamente estáveis, bem como servir de marcadores citotaxonômicos que permitem a caracterização de híbridos (MORAES et al., 2013) e a caracterização de espécies morfológicamente relacionadas (VOSA, 1985; GUERRA, 1993). Estes dados também podem ser utilizados na avaliação das relações genéticas entre as espécies e/ou populações, fornecendo um suporte adicional para hipóteses filogenéticas, bem como contribuir para o

entendimento das relações citotaxonômicas (GUERRA, 1989; 2008). Além de auxiliar no esclarecimento da evolução cariotípica de um grupo.

No presente trabalho foram analisadas através da coloração CMA/DAPI, 11 espécies pertencentes a quatro gêneros da subtribo Pleurothallidinae provenientes de coletas obtidas em diferentes regiões fisiográficas do Brasil, objetivando determinar o número cromossômico e identificar a composição das bandas heterocromáticas nessas espécies.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo determinar o número cromossômico e identificar a composição de bandas heterocromáticas visíveis em espécies brasileiras da subtribo Pleurothallidinae.

2.2. Objetivos Específicos

- Analisar sob o ponto de vista evolutivo a variabilidade cromossômica numérica entre espécies e gêneros de Pleurothallidinae do Brasil;
- Identificar a localização e composição da heterocromatina constitutiva em espécies brasileiras de Pleurothallidinae;
- Aplicar essa variabilidade na caracterização de espécies e gêneros de Pleurothallidinae.
- Divulgar os resultados dessa pesquisa através da publicação de um artigo em periódico com qualis B1 ou mais em Ciências Agrárias.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Família Orchidaceae

As orquídeas, comumente chamadas todas as espécies da família Orchidaceae Juss., são plantas herbáceas perenes com a mais diversificada morfologia, além de ser caracterizada pela presença de um perianto formado de dois verticilos trímeros (três pétalas e três sépalas), sendo uma pétala modificada denominada labelo (DRESSLER, 1993). A família tem despertado o interesse de botânicos, jardineiros e horticultores desde o início da civilização. No entanto, apenas após as grandes viagens de descoberta, as orquídeas de maior valor ornamental chegaram a Europa e seu cultivo passou a ser difundido no Mundo Ocidental (PABST & DUNGS, 1975).

As espécies da família Orchidaceae são de grande importância econômica para a horticultura, tanto para a produção de flores cortadas quanto de plantas vivas (ARDITTI, 1992; CRIBB & CHASE, 2005), como por exemplo as espécies dos gêneros *Cattleya* Lindl. e *Oncidium* Sw. Também podem ser como planta medicinal ou na indústria alimentícia (ARORA & KAPIL, 1989; CARDOSO & ISRAEL, 2005), como os tubérculos de *Orchis* L. e *Ophrys* L. que contêm altas concentrações de amido e são consumidos pelos povos primitivos do Oriente como tonificante, como também a *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews mais conhecida como baunilha, que possui utilização mundial e em escala industrial, bastante utilizada para aromatizar chocolates, doces e tortas (DUNSTERVILLE & GARAY, 1959; MAY et al., 2008).

A família Orchidaceae passou por uma profunda reorganização taxonômica, onde atualmente é subdividida em cinco subfamílias, sendo Apostasioideae, Cypripedioideae, Vanilloideae, Orchidoideae e Epidendroideae, além de 22 tribos e 49 subtribos CHASE et al., 2015). Entretanto a subfamília Epidendroideae é a de maior representatividade dentro da família, com cerca de 21.160 espécies, o que equivale a aproximadamente 76% da família Orchidaceae (FREUDENSTEIN & CHASE, 2015). A subfamília Epidendroideae é subdividida em 16 tribos e 28 subtribos das quais Pleurothallidinae é uma das que mais se destaca, pelo número de gêneros (38) e diversidade de espécies (± 4.570) (CHASE et al., 2015).

Existem poucos trabalhos em termos cariológicos, apenas cerca de 10% de todas as espécies da família Orchidaceae possuem contagem cromossômica conhecida (FELIX, 2001; SHARMA & MUKAI, 2015). A análise cromossômica proporciona o entendimento sobre a evolução cariotípica do grupo, lançando bases para esclarecer as relações filogenéticas, taxonômicas, bem como suporte ao melhoramento genético (FELIX & GUERRA, 2000, 2005;

GUERRA, 2002), como em estudos nas famílias Rutaceae (GUERRA et al., 2000) e Cyperaceae (VANZELA, 2003). Diversos estudos citogenéticos foram realizados nos mais diferentes grupos da família Orchidaceae (TANAKA & KAMEMOTO, 1984; AOYAMA et al., 1992; DAWSON et al., 2007; DAVIÑA et al., 2009; FELIX & GUERRA, 2010; OLIVEIRA et al., 2015).

Estudos realizados por Felix e Guerra (2000, 2005) foi constatado que $x = 7$ é o número cromossômico básico mais provável para família Orchidaceae, sendo que em outros grupos é possível observar uma notável constância em torno de dois números básicos como $x = 20$ e $x = 21$ corroborando que o número básico primário da família seja $x_1 = 7$, além de indicar possíveis alterações genômicas (FELIX & GUERRA, 2010). A família apresenta uma diversificação cariotípica acentuada, com registros de números cromossômicos que variam desde $2n = 12$ em *Erycina pusilla* (L.) N.H. Williams & M.W. Chase (FELIX & GUERRA, 1999) até $2n = 240$ em *Epidendrum cinnabarinum* Salzm. (GUERRA, 2000a; FELIX & GUERRA, 2010), sendo que $2n = 40$ é o número mais recorrente dentro da família (FELIX & GUERRA, 1999, 2000, 2005, 2010; OLIVEIRA et al. 2015).

Daviña et al. (2009) analisando citogeneticamente espécies de orquídeas da Argentina observaram números cromossômicos variando de $2n = 26$ em *Eltroplectris schlechteriana* (Porto & Brade) Pabst a $2n = 108$ em *Catasetum fimbriatum* (C. Morren.) Lindl. & Paxton e *Oncidium bifolium* Sims. Além disso, na maioria dos táxons analisados foi encontrado espécies com cariótipo bimodal, como também espécies poliploides nas subfamílias Orchidoideae com $2n = 26, 28, 30, 32, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 56, 64$ e em Epidendroideae com $2n = 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 46, 48, 50, 52, 54, 56$ são predominantes, embora $2n = 60, 84, 108$ também ocorreram (DAVIÑA et al., 2009).

Análises cariológicas em espécies do gênero *Epidendrum* com ênfase no subgênero *Amphiglottium* foram realizadas por Assis et al. (2013). O número cromossômico variou de $2n = 24$ em *E. fulgens* Brongn a $2n = 240$ em *E. cinnabarinum* Salzm. Ao construir uma árvore filogenética baseada na máxima verossimilhança, observou-se que o número primário básico que seria o mais parcimonioso com intuito de explicar a relação do gênero *Epidendrum* com as outras espécies da subtribo Laeliinae seria $x = 10$, embora este número não tenha sido observado nas espécies desse gênero. Já no subgênero *Amphiglottium*, $x = 12$ provavelmente representa um número restrito para este subgênero. Além disso, as outras linhagens de *Epidendrum* parecem ter sido derivadas de um estado ancestral com $x = 20$, como observado na maioria dos representantes das espécies deste gênero.

3.2 Subtribo Pleurothallidinae

Pleurothallidinae Lindl. é uma das maiores subtribos da tribo Epidendreae, subfamília Epindendroideae da família Orchidaceae (DRESSLER, 1993), que de acordo com Chase et al. (2015) possui 38 gêneros e cerca de 4.570 espécies (THE PLANT LIST, 2018). Desta forma, Pleurothallidinae representa cerca de 16% da família Orchidaceae, a qual é considerada a maior família das monocotiledôneas (CHRISTENHUSZ & BYNG, 2016). As espécies deste grupo normalmente são epífitas, podem ocorrer em ambientes rupícolas ou terrestres (LUER, 1986). Caracterizam-se por apresentar crescimento simpodial, rizoma curto ou mais ou menos rastejante, ramicaules sem pseudobulbos, unifoliados, inflorescências terminal ou raramente lateral, simples ou fasciculada com hábito de crescimento simpodial, folhas principalmente coriáceas conduplicadas, caules aéreos unifoliados que surgem de rizomas e com uma articulação entre o pedicelo e o ovário (PRIDGEON & CHASE, 2003). Como grande parte das orquídeas possuem um grande potencial econômico, as espécies da subtribo Pleurothallidinae despertam o interesse comercial por possuir flores pequenas, que chamam atenção principalmente dos colecionadores de orquídeas (MÓ et al., 2017).

Possui distribuição neotrópica e com uma maior variedade concentrada nas florestas úmidas da Costa Rica, Panamá, Colômbia, Equador, Venezuela, Peru e Brasil (PRIDGEON, 1982a, 1982b; LUER, 1986; NEYLAND et al., 1995; PRIDGEON et al., 2005). No Brasil, há registro de ocorrência para 22 gêneros e 591 espécies, dos quais 491 são endêmicas e são distribuídas principalmente pelas regiões Mata Atlântica (FLORA DO BRASIL 2020, em construção).

Com a reorganização da subtribo Pleurothallidinae baseada em análises filogenéticas e moleculares (PRIDGEON et al., 2001; PRIDGEON & CHASE, 2001, 2003; CHIRON & van den BERG, 2012; CHASE et al., 2015), houve fortes alterações nomenclaturais. Por isto, a delimitação dos gêneros tem sido bastante controversa em estudos filogenéticos, quando comparados com estudos realizados levando em consideração apenas os caracteres morfológicos. Nos trabalhos filogenéticos mais recentes (PRIDGEON et al., 2001; van den BERG et al., 2009; CHIRON et al., 2012) sugere-se que Pleurothallidinae seja um grupo monofilético. Foi proposto uma nova delimitação taxonômica para os gêneros de Pleurothallidinae que passou a abranger um total de 38 gêneros (PRIDGEON & CHASE, 2001; PRIDGEON et al., 2005; CHASE et al., 2015). Os dados citogenéticos têm contribuído para algumas análises filogenéticas e taxonômicas, diante disto, a identificação e determinação do número de cromossômico é uma ferramenta bastante útil na sistemática e na evolução das

plantas, além de complementar as informações obtidas por métodos morfológicos e moleculares, detectando poliploidia e outras alterações genômicas importantes que nem sempre são visíveis em outras abordagens (GUERRA, 2008).

3.3 Bandeamento Cromossômico

Devido à utilidade do bandeamento cromossômico na caracterização de cariótipos, muitas técnicas nas últimas décadas têm sido aprimoradas para a visualização da heterocromatina (ASSIS, 2013). Para identificar as regiões mais ricas, quantidade e composição da heterocromatina utiliza-se com mais frequência a dupla coloração com os fluorocromos CMA (Cromomicina A3) e o DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol) (GUERRA, 2000; EL-TWAB et al., 2011). O CMA irá corar mais fortemente regiões ricas em Citosina-Guanina e o DAPI regiões ricas em Adenina-Timina, respectivamente abreviadas como CG e AT (SCHWEIZER & AMBROS, 1994; SUMNER, 2003).

A subtribo Pleurothallidinae é pouco estudada cariologicamente, dos 38 gêneros apenas 12 possui representantes com os números cromossômicos analisados e a maioria dos estudos foram realizados por meio de técnicas convencionais (NAKATA & HASHIMOTO, 1983; FELIX & GUERRA, 2010; OLIVEIRA, 2015), porém não fornece informações a respeito da composição da heterocromatina. De um total de mais de 4.500 espécies deste grupo apenas 65 foram analisadas cariologicamente, aproximadamente 1,42% de toda a subtribo (NAKATA & HASHIMOTO, 1983; FELIX & GUERRA, 2010; OLIVEIRA et al., 2015). Entretanto, apenas 17 espécies possuem análises com dupla coloração por meio dos fluorocromos CMA/DAPI (OLIVEIRA et al., 2015).

O uso de técnicas que possibilitem distinguir as porções da heterocromatina com base na constituição molecular, permite uma análise mais detalhada do cariótipo, principalmente em grupos de plantas que não apresentam variação no número e na morfologia cromossômica (BARROS E SILVA & GUERRA, 2009; OLIVEIRA et al., 2015). A identificação de polimorfismos e variantes quanto aos padrões de bandas heterocromáticas, em linhagens vegetais cromossomicamente estáveis, é fundamental para a identificação de variações cromossômicas estruturais envolvidas na diversificação das espécies, bem como de marcadores citotaxonômicos confiáveis em grupos taxonomicamente complexos (VOSA, 1985; GUERRA, 1993). Além disso, estes dados podem ser utilizados na avaliação das relações genéticas entre as espécies e/ou populações, fornecendo um suporte adicional para hipóteses filogenéticas, bem como contribuir para o entendimento das relações citotaxonômicas (GUERRA, 1989; 2008).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material Analisado

Todo o material foi coletado no Brasil em diferentes regiões fisiográficas, posteriormente foram cultivados no Jardim experimental do Laboratório de Citogenética Vegetal da Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Agrárias, Areia, Paraíba. De todo o material foram preparadas exsicatas que se encontram depositadas no Herbário EAN/CCA. A Tabela 1 sumariza todas as espécies analisadas, voucheres e locais de coletas.

4.2 Análise Cromossômica

Para as preparações cromossômicas foi utilizado o protocolo proposto por Guerra e Souza (2002). Pontas de raízes foram inicialmente pré-tratadas com 1,4-Diclorobenzeno (Paradiclorobenzeno) por 4 horas, e posteriormente, fixadas em Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético), permanecendo nesta solução por 2-24 horas a temperatura ambiente, estocadas em freezer a -20°C até o preparo das lâminas. Para isto, as raízes foram digeridas em uma solução enzimática contendo 2% celulase e 20% pectinase a 37°C por 40-60 minutos, esmagadas em ácido acético 60%, as lamínulas removidas em nitrogênio líquido e envelhecidas por três dias a temperatura ambiente.

4.3 Coloração com Fluorocromos CMA/DAPI

Após envelhecimento, as lâminas foram coradas com 10 μL de Cromomicina A_3 (CMA_3) (0,1 mg/ml) durante uma hora em câmara escura, em seguida, as lamínulas foram retiradas com um jato de água destilada e secas ao ar. Posteriormente, as lâminas foram coradas com 10 μL de 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (1 $\mu\text{g/ml}$) durante 30 minutos em câmara escura, lavadas, retiradas as lamínulas, secas ao ar, e montadas em glicerol e tampão McIlvaine (pH 7,0) (1:1, v/v). Após a montagem as lâminas foram estocadas em câmara escura, a temperatura ambiente por no mínimo três dias. As melhores metáfases foram fotografadas em fotomicroscópio Zeiss com câmera de vídeo Axio Cam MRC5 usando o *software* Axiovision 4.8. As imagens foram processadas com auxílio do Photoshop CS6. Para cada espécie, células com cromossomos metafísicos foram medidos utilizando-se o *software* ImageJ® versão 1.46r.

5. RESULTADOS

5.1 Números Cromossômicos

Foram analisados citogeneticamente 11 espécies pertencentes a quatro gêneros da subtribo Pleurothallidinae, cujos números cromossômicos e padrões de bandas CMA/DAPI encontram-se sumarizados na Tabela 1. Os números cromossômicos variaram de $2n = 20$ em duas espécies de *Specklinia* a $2n = 40$ em três espécies de *Acianthera* (Tabela 1), sem ocorrência de poliploidia entre as espécies e gêneros estudados. Quanto a morfologia, predominaram cromossomos metacêntricos e submetacêntricos para todas as espécies, exceto em *Anathallis rubens* com ocorrência de um par acrocêntrico pequeno (Fig. 2A). Em geral os cariótipos foram mais ou menos simétricos, com exceção de uma espécie indeterminada de *Anathallis* ($2n=38$) que apresentou cariótipo fortemente bimodal, com sete pares de cromossomos maiores e 12 pares de cromossomos menores (Fig. 2C). Em geral os cromossomos foram relativamente menores, com tamanhos médios variando desde $1,3\mu\text{m}$ em *Stelis loefgrenii* e *Specklinia picta*, até $2,8\mu\text{m}$ no conjunto de cromossomos maiores de *Anathallis* sp. Foram confirmadas todas as contagens previamente referidas para seis das espécies analisadas, enquanto contagens inéditas foram registradas para *Acianthera macuconensis* ($2n = 34$), *A. panduripetala* ($2n = 40$), *Stelis intermedia* e *S. loefgrenii* ambas com $2n = 32$.

5.2 Bandeamento com CMA/DAPI

A dupla coloração com os fluorocromos CMA e DAPI mostrou quatro tipos de heterocromatina sensíveis a esses fluorocromos: bandas $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^-$, $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^0$, $\text{DAPI}^+/\text{CMA}^-$ e $\text{DAPI}^+/\text{CMA}^0$ (Tabela 1), com variação para número, localização e tamanho das bandas heterocromáticas entre espécies e gêneros estudados. Em *Acianthera capillaris* foram observadas bandas CMA^+ subterminais e pericentroméricas na maioria dos cromossomos (Fig. 1A), diferindo de *Acianthera panduripetala* que apresentou na região proximal, ocupando mais da metade da extensão de seis pares cromossômicos (Fig. 1C). Para *A. saundersiana* (Fig. 1D) foi observada uma banda $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^-$ terminal em um par cromossômico pequeno, além de regiões $\text{CMA}^+/\text{DAPI}^0$ nos braços curtos ou em ambos os braços dos demais cromossomos do complemento. Por outro lado, *Acianthera macuconensis* com $2n = 34$ apresentou apenas pequenas bandas CMA terminais em um dos pares cromossômicos menores (Fig. 1B). Regiões mais fortemente coradas com DAPI ($\text{DAPI}^+/\text{CMA}^0$) foram observadas nos terminais de vários pares cromossômicos de *A. capillaris* e *A. saundersiana*. Para o gênero *Anathallis*, *A. rubens*

não foram visualizadas bandas CMA ou DAPI nas duas populações analisadas (Figs. 2A-B)., enquanto *Anathallis* sp. apresentou um par cromossômico com pequenas bandas CMA terminais e pequenas bandas DAPI na região pericentromérica. Para o gênero *Stelis*, as três espécies analisadas apresentaram apenas uma banda CMA heteromórfica por complemento monoploide (Figs. 1E-G), enquanto as duas espécies de *Specklinia* apresentaram padrões de bandas similares, com blocos DAPI⁺/CMA⁻ na região proximal de nove pares cromossômicos e um bloco CMA⁺/DAPI⁻ em um dos pares cromossômicos menores.

6. DISCUSSÃO

6.1. Variação cromossômica numérica

De um total de 4.570 espécies de Pleurothallidinae conhecidas (CHASE et al., 2015), há registros cromossômicos prévios para apenas 65 espécies, o que somado aos quatro registros inéditos do presente trabalho perfaz 69 espécies o que corresponde a apenas 1,51% das espécies reconhecidas para a subtribo. Apesar de ser cariologicamente muito pouco conhecida, o grupo evidencia uma ampla variação cromossômica numérica, desde $2n = 20$ em duas espécies de *Specklinia*, até $2n = 84$ em *Pleurothallis bivalivis* Lindl. com ocorrência de séries disploides e poliploides dentro de um mesmo gênero e entre diferentes gêneros (revisado por OLIVEIRA et al., 2015). Em *Acianthera*, por exemplo, nossa amostragem revelou três números cromossômicos diferentes para apenas quatro espécies analisadas, com $2n = 34$, 36 e 40 . Esses dados corroboram os registros prévios para o gênero para *Acianthera* com $2n = 40$ para 10 espécies, $2n = 42$ em quatro outras e números cromossômicos variando descontinuamente desde $2n = 34$ a $2n = 56$, confirmando o número básico $x = 20$ para o gênero com eventos de disploidias ascendentes ou descendentes (FELIX & GUERRA, 2010; OLIVEIRA et al., 2015). O gênero *Acianthera* é formado por 118 espécies principalmente da Mata Atlântica, sendo até o momento o gênero de Pleurothallidinae citogeneticamente mais bem amostrado, com números cromossômicos (incluindo o presente trabalho) reportados para 24 espécies (20,34% das espécies do gênero). Caso essa variação numérica seja confirmada em outras espécies do gênero, *Acianthera* passará a ser o gênero de Orchidaceae com a mais longa série disploide que se tem conhecimento.

Os demais gêneros analisados na presente amostra foram numericamente mais estáveis com $2n = 30$ para as duas espécies de *Anathallis*, $2n = 32$ para *Stelis* e $2n = 20$ para *Specklinia*. Todavia, *Anathallis*, com 152 espécies das quais 92 para o Brasil (FLORA DO BRASIL 2020,

em construção), possui apenas cinco espécies com registros prévios, com $2n = 30$ (duas espécies), $2n = 36$ e $2n = 40$ para outras duas. Nossa contagem de $2n = 30$ para *A. rubens*, confirmou o único registro prévio para a espécie (OLIVEIRA et al., 2015), enquanto a contagem inédita de $2n = 38$ para uma espécie indeterminada do gênero, sugere que poderá haver em *Anathallis* uma série dispoloide mais completa. *Stelis*, o segundo maior gênero de Pleurothallidinae (879 espécies), mas possui apenas 18 espécies com números cromossômicos conhecidos (incluindo as duas contagens inéditas do presente trabalho) é notavelmente estável, com $2n = 32$ para todas as espécies amostradas até a presente data. Esse número é compatível com $x = 15$ que foi sugerido a partir da reconstrução filogenética do número básico ancestral para o gênero (OLIVEIRA et al., 2015). O gênero *Specklinia* composto por 135 espécies, possui apenas duas espécies com números cromossômicos conhecidos, ambas reanalisadas no presente trabalho, $2n = 20$ para *S. grobyi* e *S. picta*, esse é o menor número da série dispoloide que enfatiza a importância da dispoloidia na evolução cromossômica de Pleurothallidinae a partir de um número básico ancestral $x = 20$, conforme sugerido por Oliveira et al. (2015).

Finalmente, uma espécie indeterminada de *Anathallis* apresentou acentuada bimodalidade cariotípica com 14 cromossomos grandes e 24 cromossomos pequenos. Espécies com bimodalidade cariotípica têm sido tradicionalmente associadas a eventos de hibridização na formação da espécie, o que provavelmente tenha ocorrido na espécie analisada de *Anathallis*. Essa premissa tem sido confirmada em grupos não relacionados, como em *Milium vernale* M.Bieb. (BENNETT et al., 1992), *Emilia fosbergii* Nicolson (MORAES & GUERRA, 2010) e na subfamília Agavoideae de Asparagaceae (MCKAIN et al., 2012). Curiosamente, *Anathallis* sp. possui dois conjuntos de cromossomos sem nenhuma equivalência com qualquer outra Pleurothallidinae cariológicamente analisada. Nesse sentido, é possível que suas espécies parentais nunca tenham sido analisadas cromossomicamente, ou sejam atualmente extintas.

6.2. Variações no Padrão de Bandas CMA/DAPI

As 11 espécies dos quatro gêneros analisadas na presente amostra apresentaram heterocromatina constitutiva em quatro padrões distintos: Espécies com pequenas bandas CMA terminais restritas as RONS heterocromáticas (a maioria das espécies), espécies com bandas CMA pericentroméricas (observadas em três espécies de *Acianthera*) e espécies com bandas DAPI pericentroméricas, nas duas espécies de *Specklinia*. Embora a fração heterocromática do genoma tenha sido por muito tempo considerado lixo genético, fica cada vez mais claro que essa fração apresenta um variável conjunto de funções e desempenham um importante papel na evolução de plantas e animais (BIÉMONT & VIEIRA, 2006; DÍAZ-CASTILLO, 2017). Entre

as espécies estudadas aqui, a ocorrência de blocos de heterocromatina proximal já havia sido associada a espécies de *Acianthera*, em especial nas espécies da secção *Sicarieae* subsection *Pectinata* (Luer) Chiron & van den Berg. Contudo, das três espécies com grandes blocos de heterocromatina CMA⁺, apenas *A. panduripetala* está inserida nessa subsecção. As outras duas espécies, *A. capillaris* e *A. saundersiana* pertencem às secções *Artosiae* e *Auritae* respectivamente, sugerindo que grandes quantidades de heterocromatina CMA⁺ teria uma distribuição mais ampla em *Acianthera* do que havia sido anteriormente proposto por Oliveira et al. (2015). O outro grupo de espécies com grandes quantidades de heterocromatina, o gênero *Specklinia*, apresentou heterocromatina DAPI⁺CMA⁻ proximal ladeada por blocos CMA em *S. grobyi* e *S. picta*. Todavia, as duas espécies se diferenciaram pela presença de bandas CMA ladeando os blocos DAPI em *S. grobyi*, que foram ausentes em *S. picta*. Uma análise mais ampla da distribuição da heterocromatina nesse gênero poderá esclarecer a importância desses blocos de heterocromatina como ferramenta citotaxonômica na caracterização de *Specklinia* e na separação de suas espécies. Finalmente, o terceiro grupo de Pleurothallidinae com pouca heterocromatina constitutiva, formado por algumas espécies de *Acianthera* e todas as espécies analisadas de *Anathallis* e *Stelis*, corrobora a importância dessa característica na delimitação citotaxonômica de alguns gêneros de Pleurothallidinae. Notavelmente *Stelis*, que teve pouca ou nenhuma heterocromatina visualizada nas cinco espécies previamente analisadas pela coloração CMA/DAPI, manteve essa mesma característica nas quatro espécies aqui analisadas.

Embora seja necessário amostrar uma quantidade muito maior de espécies, os dados disponíveis para a distribuição da heterocromatina em Pleurothallidinae, revelaram um potencial importante para o emprego citotaxonômico dessa técnica de coloração diferencial. Assim como os números cromossômicos são muito variáveis, o padrão de bandas CMA/DAPI parece ser igualmente variável. Em nossa amostra, foi possível confirmar *Stelis* como um gênero caracterizado por uma pequena quantidade de heterocromatina rica em GC, enquanto em *Specklinia* os maiores blocos heterocromáticos foram excepcionalmente ricos em AT. Todavia, o potencial para uso do padrão de bandas CMA/DAPI como ferramenta citotaxonômica e de evolução cromossômica em Pleurothallidinae, ainda permanece desconhecido pelo pequeno número de espécies estudadas até o momento pela técnica de coloração CMA/DAPI.

Tabela 1. Espécies subtribo Pleurothallidinae analisadas por meio de dupla coloração com fluorocromos. Sumarizadas por gênero e espécie, coletor, número, local de coleta, contagens cromossômicas prévias (CP), números cromossômicos determinados no presente trabalho (PT), tipos de bandas CMA/DAPI e variação do tamanho médio cromossômico (µm).

Táxon	Coletor	Local de coleta†	CP* 2n	PT 2n	Bandas heterocromáticas				Tamanho cromossômico médio (µm)	Figura
					CMA ⁺ /DAPI ⁻	DAPI ⁺ /CMA ⁻	DAPI ⁺ /CMA ⁰	CMA ⁺ /DAPI ⁰		
<i>Acianthera</i> Scheidw.										
<i>A. capillaris</i> (Lindl.) Pridgeon & M.W.Chase	EMAlmeida, 1044	Santa Teresinha – BA	40	40	ca. 30 peri/st	–	8 term	–	1,5	1A
<i>A. macuconensis</i> (Barb.Rodr.) F.Barros	EMAlmeida 1458	Una – BA	–	34**	2 term	–	–	–	1,8	1B
<i>A. panduripetala</i> (Barb.Rodr.) Pridgeon & M.W.Chase	LPFelix 16534	Quatro Barras – PR	–	40**	12 prox	–	–	–	1,8	1C
<i>A. saundersiana</i> (Rchb.f.) Pridgeon & M.W.Chase	LPFelix 13812	Maranguape – CE	36	36	2 term	–	ca. 36 term	6 peri	1,6	1D
<i>Anathallis</i> Barb.Rodr.										
<i>A. rubens</i> (Lindl.) Pridgeon & M.W.Chase	LPFelix 16563	Mirante 1 – PR	30	30	–	–	–	–	1,4	2A
	LPFelix S/N	M. do Chapéu – BA	30	30	–	–	–	–	1,4	2B
<i>Anathallis</i> sp.	LPFelix 16439	Comodoro - MT	-	38**	6 term	ca 30 peri	–	–	1,3/2,8	2C
<i>Stelis</i> Sw.										
<i>S. aprica</i> Lindl.	AMSSANTOS 13	Uruburetama - CE	32	32	1 term	–	–	–	1,5	1E
	LPFelix 15109	Pacoti – CE								
<i>S. intermedia</i> Poepp. & Endl.	EMAlmeida 1293	BA	–	32**	1 peri	–	–	–	1,4	1F
<i>S. loefgrenii</i> Cogn.	LPFelix 13808	Maranguape – CE	–	32**	1 peri	–	–	–	1,3	1G
<i>Specklinia</i> Lindl.										
<i>S. grobyi</i> (Bateman ex Lindl.) F.Barros	LPFelix 17226.1	Manaus – AM	20	20	2 peri	18 prox	–	–	1,4	2D
	LPFelix 17226	Manaus – AM	20	20						

Continuação...

<i>S. picta</i> (Lindl.) Pridgeon & M.W.Chase	LPFelix 16317	Novo Airão – AM	20	20	2 peri	18 prox	–	–	1,3	2E
	LPFelix 17225	Manaus – AM	20	20						

† Estados Brasileiros referentes aos locais de coleta: AM, Amazonas; BA, Bahia; CE, Ceará; MT, Mato Grosso; PR, Paraná. *Fonte para as contagens cromossômicas prévias: Chromosome Counts Database (CCDB), 2018; Felix & Guerra (2010); Oliveira et al., (2015) **Contagem inédita para a espécie. As posições das bandas nos cromossomos estão abreviadas como segue: Term = Terminais; Peri = Pericentroméricas; Prox = Pro; St = Subterminal

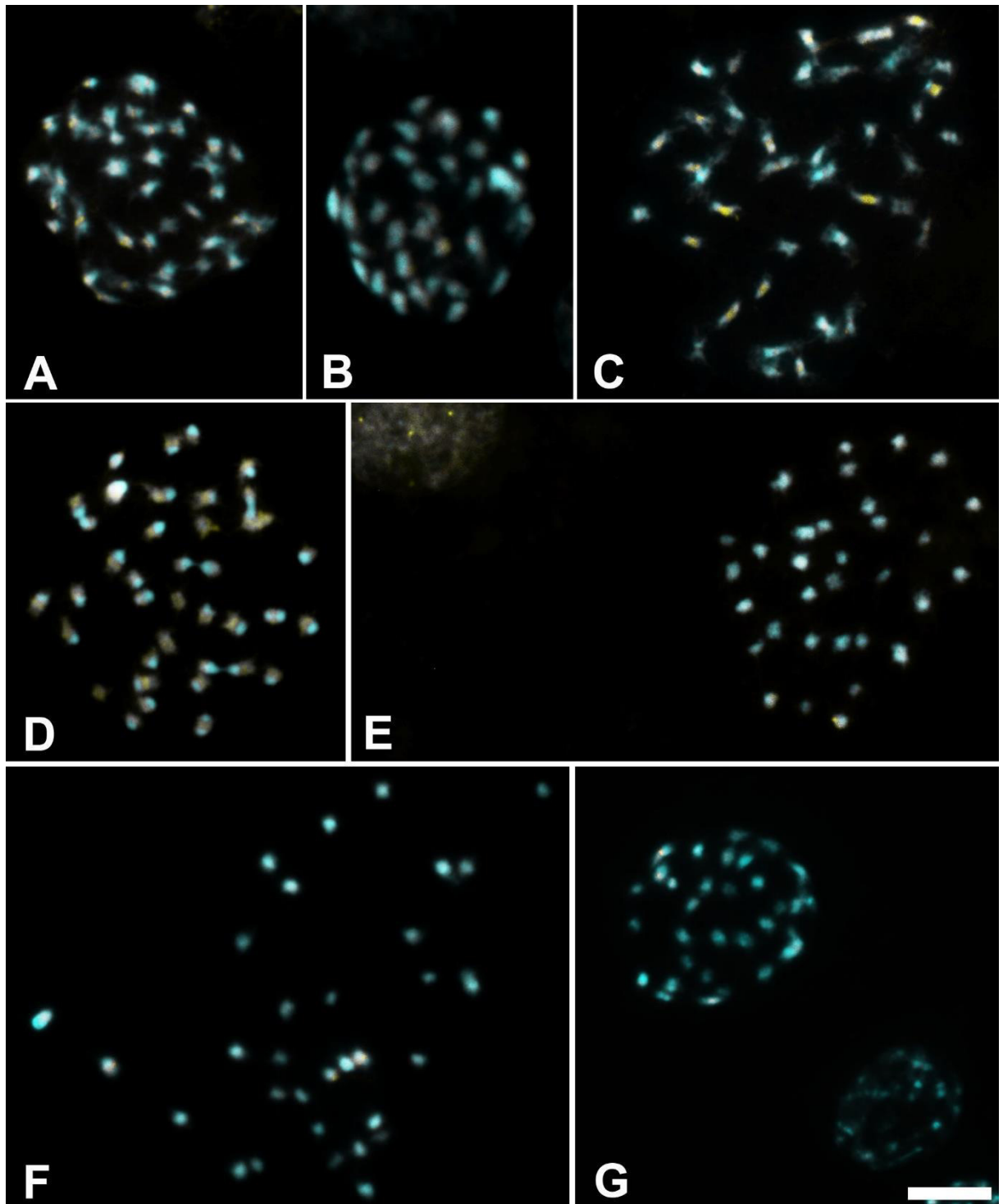


Figura 1. Metáfases mitóticas das espécies da subtribo Pleurothallidinae coradas com os fluorocromos CMA/DAPI. **A.** *Acianthera capillaris* com $2n = 40$; **B.** *Acianthera macuconensis* com $2n = 34$; **C.** *Acianthera panduripetala* com $2n = 40$; **D.** *Acianthera saundersiana* com $2n = 36$; **E.** *Stelis aprica* com $2n = 32$; **F.** *Stelis intermedia* com $2n = 32$; **G.** *Stelis loefgrenii* com $2n = 32$. Barra em **G** corresponde a $10\mu\text{m}$.

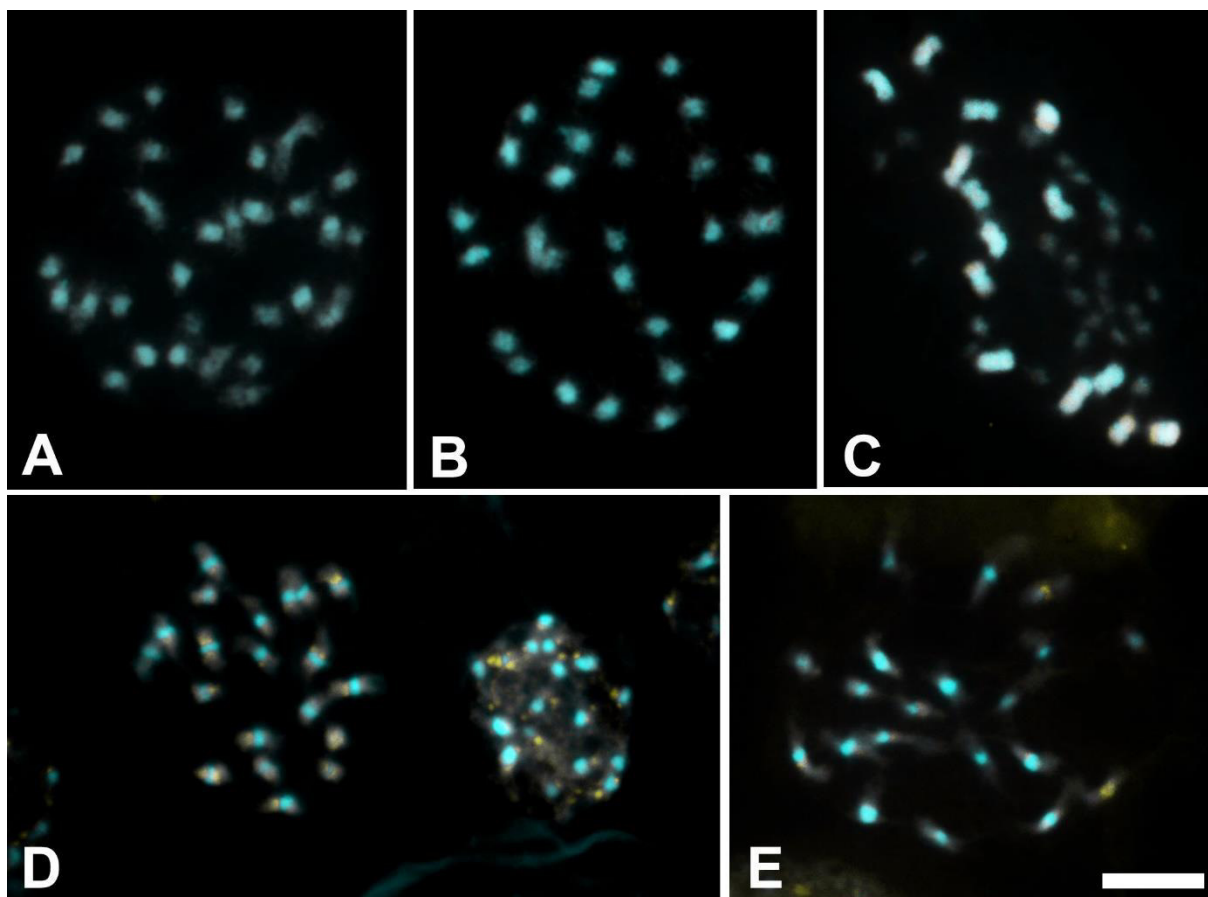


Figura 2. Metáfases mitóticas das espécies da subtribo Pleurothallidinae coradas com os fluorocromos CMA/DAPI. **A.** *Anathallis rubens* com $2n = 30$; **B.** *Anathallis rubens* com $2n = 30$; **C.** *Anathallis* sp. com $2n = 38$; **D.** *Specklinia grobyi* com $2n = 20$; **E.** *Specklinia picta* com $2n = 20$; Barra em **E** corresponde a $10\mu\text{m}$.

7. CONCLUSÃO

O número cromossômico das espécies da subtribo Pleurothallidinae analisadas no presente trabalho variaram de $2n = 20$ no gênero *Specklinia* a $2n = 40$ em *Acianthera*;

As espécies da subtribo Pleurothallidinae apresentam bandas heterocromáticas CMA⁺ e DAPI⁺, variando em localização, número e tamanho. Desta forma, a identificação da composição heterocromática se torna uma importante ferramenta citotaxonômica para o grupo;

Neste sentido, se faz necessário uma análise de um maior número de espécie por meio da coloração com fluorocromos (CMA/DAPI) e outras técnicas como a Hibridização *in situ* Fluorescente para identificar como a composição heterocromática seria uma sinapomorfia para os gêneros e espécies da subtribo Pleurothallidinae.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAGESEN, L.; SANZO, A. M. The Phylogeny of the Alstroemeriaceae, Based on Morphology, rps16 Intron, and rbcL Sequence Data. **Systematic Botany**, v. 28, n. 1, p. 47–69. 2003.
- AOYAMA, M.; CHEN, S.-C.; ZHANG, D.-M.; TANAKA, R.; NAKATA, M. Chromosome numbers of some species of the Orchidaceae from China (1). **Journal of Japanese Botany**, v. 67, p. 330–334. 1992.
- ARDITTI, J. **Fundamentals of orchid biology**. New York: J. Wiley and Sons, 691p. 1992.
- ARORA, S.; KAPIL, R. N. Comparative study of pollinia of two species of *Pholidota* Lindl. **Phytomorphol.** v. 39, n. 4, p. 343-52. 1989.
- ASSIS, F. N. M.; SOUZA, B. C. Q.; MEDEIROS-NETO, E.; PINHEIRO, F.; SILVA, A. E. B.; FELIX, L.P. Karyology of the genus *Epidendrum* (Orchidaceae: Laeliinae) with emphasis on subgenus *Amphiglottium* and chromosome number variability in *Epidendrum secundum*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 172, p. 329–344. 2013.
- ASSIS, F. N. M. Mecanismos de Evolução Cariotípica em *Epidendrum* L. (Orchidaceae: Epidendroideae). **Tese** (Doutorado em Agronomia). Universidade Federal da Paraíba. Areia. 132p. 2013.
- BARROS, F. Notas taxonômicas para espécies brasileiras dos gêneros *Acianthera*, *Anathallis*, *Specklinia* e *Heterotaxis* (Orchidaceae). **Hoehnea**, v. 32, p. 421–428. 2005
- BARROS E SILVA, A. E.; GUERRA M. The meaning of DAPI bands observed after C-banding and FISH produces. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 85, n. 2, p. 115-125, 2009.
- BENNETT, S. T.; KENTON, A. Y.; BENNETT, M. D. Genomic in situ hybridization reveals the allopolyploid nature of *Milium montianum* (Gramineae). **Chromosoma**, v. 101, p. 420–424, 1992.
- BIÉMONT, C.; VIEIRA, C. Junk DNA as an evolutionary force. **Nature**, v. 443, p. 521-524, 2006.
- CAMERON, K.M.; CHASE, M.W.; WHITTEN, W.M.; KORES, P.J.; JARRELL, D.C.; ALBERT, V.A.; YUKAWA, T.; HILLS, H.G.; GOLDMAN, D.H. A phylogenetic analysis of Orchidaceae: Evidence from rbcL nucleotide sequences. **American Journal of Botany**, v. 86, p. 208-224. 1999.

CARDOSO, J. C.; ISRAEL, M. Levantamento de espécies da família Orchidaceae em Águas de Sta. Bárbara (SP) e seu cultivo. **Horticultura Brasileira**: Brasília, v. 23, n. 2, 2005.

CHACÓN, J.; SOUSA, A.; BAEZA, C. M.; RENNER, S. S. Ribosomal DNA Distribution and a Genus-Wide Phylogeny Reveal Patterns of Chromosomal Evolution In *Alstroemeria* (Alstroemeriaceae). **American Journal of Botany**, v. 99, n. 9, p. 1501–1512. 2012.

CHASE, M. W.; CAMERON, K. M.; FREUDENSTEIN, J. V.; PRIDGEON, A. M.; SALAZAR, G.; VAN DEN BERG C.; SCHUITMAN, A. An updated classification of Orchidaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 177, p. 151-174, 2015.

CHIRON, G. R.; GUIARD, J.; van den BERG, C. Phylogenetic relationships in Brazilian *Pleurothallis sensu lato* (Pleurothallidinae, Orchidaceae): evidence from nuclear ITS rDNA sequences. **Phytotaxa**, v. 46, p. 34–58, 2012.

CHIRON, G. R. & VAN DEN BERG, C. Révision taxonomique du genre *Acianthera* (Orchidacea, Pleurothallidinae). **Richardiana**, v.12, n. 2, p. 59-77, 2012.

CHRISTENHUSZ, M. J. M.; BYNG, J. W. The number of known plants species in the world and its annual increase. **Phytotaxa**, v. 261, n. 3, p. 201-217, 2016.

CRIBB, P.J.; CHASE, M.W. Distribution. In: Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN, eds. **Genera orchidacearum**, Vol. 3. Oxford: Oxford University Press, 3. 2005.

DARLINGTON, C.D.; WYLIE, A. P. **Chromosome atlas of flowering plants**. George Allen and Unwin Ltd., London, UK. 519p. 1955.

DAVIÑA, J. R.; GRABIELE, M.; CERUTTI, J. C.; HOJSGAARD, D. H.; ALMADA, R. D.; INSAURRALDE, I. S. E.; HONFI, A. I. Chromosome studies in Orchidaceae from Argentina. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, n. 4, p. 811-821. 2009.

DAWSON, M. I.; MOLLOY, B. P. J. AND E BEUZENBERG, E. J. Contributions to a chromosome atlas of the New Zealand flora—39. Orchidaceae. **New Zealand Journal of Botany**, v. 45, p. 611-684. 2007.

DÍAZ-CASTILLO, C. Transcriptome dynamics along axolotl regenerative development are consistent with an extensive reduction in gene expression heterogeneity in dedifferentiated cells. **PeerJ** 5, e4004. doi:10.7717/peerj.4004, 2017.

DRESSLER, R. L. **Phylogeny and Classification of the Orchid Family**. Dioscorides Press, Portland, v. 314 p., 1993.

DUNSTERVILLE, G. C. K.; GARAY, L. A. **Venezuelan orchids illustrated I**. London: André Deustsch, 448p. 1959.

EL-TWAB, M. H. A.; MOTOHASHI, T.; FUJISE, A.; TATARENKO, E.; KONDO, K.; KHOLBOEVA, S. A.; GOMBOCYRENOVICH, D. Characterization of chromosome complements in *Filifolium sibilicum* (L.) Kitamura by aceto-orcein, CMA, DAPI and FISH 5S and 45S rDNA. **Chromosome Botany**, v. 6, p. 75-80, 2011.

FELIX, L. P. Citogenética e citotaxonomia de orquídeas do Brasil, com ênfase no gênero *Habenaria* Willd. **Tese** (Doutorado em Botânica), Universidade Federal de Pernambuco. Recife. 221p. 2001.

FELIX, L. P.; GUERRA, M. 1999. Chromosome analysis in *Psychmorchis pusilla* (L.) Dodson Dressler: the smallest chromosome number known in Orchidaceae. **Caryologia**, v. 52, p. 165–168. 1999.

FELIX, L. P.; GUERRA, M. Cytogenetics and cytotaxonomy of some Brazilian species of cymbidioid orchids. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 4, p. 957–978. 2000.

FELIX, L.P.; GUERRA, M. Basic chromosome number of terrestrial orchids. **Plant Systematics and Evolution**, v 254, n. 3, p. 131–148. 2005

FELIX, L. P.; GUERRA M. Variation in chromosome number and the basic number of subfamily Epidendroideae (Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 163, p. 234 – 278. 2010.

FLORA DO BRASIL 2020, *em construção*. **Orchidaceae**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB10986>>. Acesso 25 de nov de 2018.

FREUDENSTEIN, J. V.; CHASE, M. W. Phylogenetic relationships in Epidendroideae (Orchidaceae), one of the great flowering plant radiations; progressive specialization and diversification. **Annals of Botany**, p.66–681. 2015.

GUERRA, M. **Introdução à Citogenética Geral**. Editora Guanabara: Rio de Janeiro, 142p. 1989.

GUERRA, M. Cytogenetics of Rutaceae. V. High chromosomal variability in *Citrus* species revealed by CMA/DAPI staining. **Heredity**, v. 71, p. 234–241. 1993.

GUERRA, M. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, p. 1029-1041, 2000.

GUERRA, M. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. **Cytogenetics and Genome Research**, v. 120, p. 339–350. 2008.

KARREMANS, A. P. *GENERA PLEUROTHALLIDINARUM*: An updated phylogenetic overview of Pleurothallidinae. **Lankesteriana**, v. 16, ed. 2, p. 219–241. 2016.

LUER, C. A. Icones Pleurothallidarum I. Systematics of the Pleurothallidinae. **Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden**, v. 15, 81p., 1986.

LUER, C. A. A Systematic Method of Classification of the Pleurothallidinae Versus a Strictly Phylogenetic Method. **Selbyana**, v. 23, n. 1, p. 57-110. 2002.

LUER, C. A. Icones Pleurothallidarum XXIX. A Third Century of *Stelis* of Ecuador, Systematics of *Apoda-Prorepentia*, Systematics of Miscellaneous Small Genera, Addenda New Genera, Species and Combinations (Orchidaceae). **Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden**. v. 112, p.1–130. 2007.

MAY, A.; MORAES, A. R. A; CASTRO, C. E. F.; JESUS, J. P. F.F. **Baunilha**. Disponível em: < http://www.iac.sp.gov.br/imagem_informacoestecnologicas/46.pdf >. Acesso em novembro de 2018. 2006.

MCKAIN, M. R.; WICKETT, N.; ZHANG, Y.; AYYAMPALAYAM, S.; MCCOMBIE, W. R.; CHASE, M. W.; PIRES, J. C., et al. Phylogenomic analysis of transcriptome data elucidates co-occurrence of a paleopolyploid event and the origin of bimodal karyotypes in Agavoideae (Asparagaceae). **American Journal of Botany**, v. 99, p. 397–406, 2012.

MÓ, E.; CETZAL-IX, WILLIAM; BASU, S. K.; NOGUERA-SAVELLI, E.; VEGA, H.; CASANOVA-LUGO, F.; PALLANDRE, J.-M. Diversity of Pleurothallidinae in Guatemala: An Endangered Orchid Subtribe with High Economic and Horticultural Potentials. **International Journal on Environmental Sciences**, v. 8, n. 1, p. 64-86. 2017.

MORAES, A. P.; GUERRA, M. Cytological differentiation between the two subgenomes of the tetraploid *Emilia fosbergii* Nicolson and its relationship with *E. sonchifolia* (L.) DC. (Asteraceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 287, p. 113–118, 2010.

MORAES, A. P.; LEITCH, I. J.; LEITCH, A. R. Chromosome studies in Orchidaceae: karyotype divergence in Neotropical genera in subtribe Maxillariinae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 170, n. 1, p. 29-39. 2012

NAKATA, M.; HASHIMOTO, T. Karyomorphological studies on species of *Pleurothallis*. **Annals of the Tsukuba Botanical Garden**, v. 2, p. 11-32. 1983.

NEYLAND, R.; URBATSCH, L. E.; PRIDGEON, A. M. A phylogenetic analysis of subtribe *Pleurothallidinae* (Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 117, n. 1, p. 13–28. 1995.

OLIVEIRA, I. G.; MORAES, A. P.; ALMEIDA, E. M.; ASSIS, F. N. M.; CABRAL, J. S.; BARROS, F.; FELIX, L. P. Chromosomal evolution in *Pleurothallidinae* (Orchidaceae: Epidendroideae) with an emphasis on the genus *Acianthera*: chromosome numbers and heterochromatin. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 178, p. 102–120. 2015.

PABST, G. F. J.; DUNGS, F. **Orchidaceae Brasiliensis**. Band 1. Hildesheim: Brücke-Verlag Kurt Schmiersow, 408p. 1975

PRIDGEON, A. M. Numerical analysis in the classification of the *Pleurothallidinae* (Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 85, p. 103–131. 1982a.

PRIDGEON, A. M. Diagnostic anatomical characters in the *Pleurothallidinae* (Orchidaceae). **American Journal of Botany**, v. 69, n. 6, p. 921–938. 1982b.

PRIDGEON, A. M. & CHASE, M. W. A phylogenetic reclassification of the *Pleurothallidinae* (Orchidaceae). **Lindleyana**, v. 16, p. 235–271. 2001.

PRIDGEON, A. M. & CHASE, M. W. Phylogenetics of the subtribe *Pleurothallidinae* (Epidendroideae: Orchidaceae) based on combined evidence from DNA sequences. **Lankesteriana**, v. 7, 49–50. 2003.

PRIDGEON, A. M.; SOLANO R.; CHASE M. W. Phylogenetic relationships in *Pleurothallidinae* (Orchidaceae): combined evidence from nuclear and plastid DNA sequences. **American Journal of Botany**, v. 88, p. 2286–2308. 2001.

PRIDGEON, A. M.; CRIBB, P. J.; CHASE, M. W. RASMUSSEN, F. N. (eds). *Genera Orchidacearum*. Volume 4. **Epidendroideae (Part 1)**. Oxford: Oxford University Press, p. 696. 2005.

SHARMA, S. K.; MUKAI, Y. Chromosome research in orchids: current status and future prospects with special emphasis from molecular and epigenetic perspective. **The Nucleus**, v. 58, n. 3, p. 173–184. 2015.

SCHWEIZER, D.; AMBROS, P. F. Chromosome banding. Stain combinations for specific regions. **Methods in Molecular Biology**, v. 29, p. 97-112. 1994.

SUMNER, A. T. **Chromosomes: organization and function**. Blackwell Publishing Ltd. United Kingdom. 287p. 2003.

TANAKA, R.; KAMEMOTO, H. Chromosomes in orchids: counting and numbers. *In*: J. Arditti, (eds.). **Orchid Biology Reviews and Perspective III**. Ithaca: Coenell University Press, p. 324-410. 1984.

THE PLANT LIST. *Lepanthes Sw., Stelis Sw., e Masdevallia Ruiz & Pav.* Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/>>. Acesso: 25 de nov de 2018.

VOSA, C. G. **Chromosome banding in plants**. *In*: Chromosome and Cell Genetics (Sharma AK. and Sharma A., eds.). Gordon and Breach Science Publishers, London, p. 79-104. 1985.

van den BERG, C., et al. A phylogenetic study of Laeliinae (Orchidaceae) based on combined nuclear and plastid DNA sequences. **Annals of Botany**, v. 104, p. 417–430. 2009.

VANZELA, A. L. L. Localization of 45S rDNA and telomeric sites on holocentric chromosomes of *Rhynchospora tenuis* Link (Cyperaceae). **Genetic and Molecular Biology**, 26:199-201. 2003.